نشریه دانش آب و خاک/ جلد 22 شماره 2/ سال 1391

اثر سیدروفورهای میکروبی تولید شده بوسیله سویه‌های بومی *ازتوباکتر کروکوکوم* بر جذب عناصر کم مصرف در گندم

لقمان رحیمی[1*]، ناصر علی‌اصغرزاد[2]، شاهین اوستان[3] و داود فرجزاده[4]

تاریخ دریافت:88/8/20 تاریخ پذیرش: 89/10/19

1- مدرس مدعو، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران

2و3- استاد و دانشیار، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

4- استادیار، دانشگاه تربیت معلم آذربایجان

* مسئول مکاتبه: Email: rahimiloghman@yahoo.com

چکیده

در این آزمایش 14 سویه *ازتوباکتر* کروکوکوم جداسازی شده از مزارع گندم اطراف تبریز از نظر توان تولید سیدروفور در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از محیط کشت جامد حاوی کروم‌آزرول-اس مورد ارزیابی قرار گرفتند که برخی از سویه‌های مورد بررسی از توان تولید سیدروفور نسبتاً بالائی برخوردار بودند. سپس با استفاده از خاک سترون در یک آزمایش گلخانه‌ای با گیاه گندم بهاره رقم فلات در قالب طرح کاملاً تصادفی با 16 تیمار شامل 14 سویه باکتری، شاهد مثبت (با کود نیتروژن و بدون باکتری) و شاهد منفی (بدون کود نیتروژن و بدون باکتری) با چهار تکرار، اثر آنها بر جذب Fe ، Zn، Mn و Cu توسط این گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه آماری و مقایسه میانگین‌ها نشان داد که مایه زنی با باکتری بر غلظت و مقدار عناصر Fe، Zn و Cu بخش هوائی و ریشه گیاه، مقدار Mn ریشه گیاه و همچنین انتقال عناصر Fe، Zn و Cu از ریشه به بخش هوائی اثر معنی‌داری داشت. اثر مایه‌زنی باکتری بر غلظت و مقدار Mn بخش هوائی، غلظت Mn ریشه و انتقال Mn از ریشه به بخش هوائی معنی‌دار نشد. نتایج نشان داد سویه-های برتری که در شرایط درون شیشه‌ای از توان تولید سیدروفور بالائی برخوردار بودند باعث افزایش غلظت و مقدار Fe و همچنین انتقال این عنصر از ریشه به بخش هوائی گیاه گندم شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: *ازتوباکتر* کروکوکوم، سیدروفور، گندم، عناصر کم مصرف، CAS-آگار

Effects of Microbial Siderophores Produced by Native *Azotobacter chroococcum* Strains on Micronutrients Uptake by Wheat Plant

L Rahimi[1], N Aliasgharzad[2], S Oustan[3] and D Farajzadeh[4]

Received: November 11, 2009 Accepted: January 9, 2011
[1]Dept. of Agric., Univ. of Payame Noor, Tehran, Iran.
[2,3] Porf. and Assoc. Prof., Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz, Iran
[3]Assist. Prof., Univ. of Tarbiat Moallem Azarbayjan, Iran
*Corresponding author Email: rahimiloghman@yahoo.com

Abstract

In this study, 14 strains of *A. chroococcum* isolated from wheat grown fields around the city of Tabriz, in northwest of Iran, were assayed for siderophore production using chrome azurol-S agar (CAS-agar) method under in-vitro conditions. Results showed that some strains had relatively higher ability in siderophore production. In a pot culture experiment with sterile soil, wheat plants (*Triticum aestivum* L.CV. Falat) were inoculated with 14 bacterial strains. Positive control received nitrogen fertilizer without bacterial inoculation and negative control was left un-inoculated and without N- fertilizer. Totally, 16 treatments with four replications were arranged in completely randomized design. Concentartions and contents of Fe, Cu, Zn and Mn in shoot and root as well as translocations of these elements from root to the shoot were determined at the harvest time. Results showed that the inoculation with *Azotobacter* had significant effects on concentrations and contents of Fe, Zn and Cu in shoot and root. Translocations of Fe, Zn and Cu from root to the shoot were markedly increased in bacterial treatments compared to the positive and negative controls. Mn concentration and content as well as its translocation from root to the shoot were not significantly affected. In-vitro assessment of siderophore production revealed that the higher siderophore production in bacterial stains was in accordance with higher Fe in plant tissue and its translocation as well.

Key words: *Azotobacter chroococcum*, Siderophore, Wheat, Micronutrients, CAS-agar

مقدمه

در بیشتر خاکهای ایران، pH بالای خاک منجر به کاهش قابلیت دسترسی عناصر Fe، Mn، Zn و Cu برای گیاهان می‌گردد. در چنین خاکهائی اغلب گیاهان از جمله گندم (*Triticum aestivum* L.) از کمبود این عناصر رنج می‌برند. همچنین Fe مهمترین عنصر غذائی کم مصرف است که نقش عمده‌ای را در تولید محصول دارا می‌باشد. این عنصر هر چند می‌تواند از طریق

کودهای شیمیائی و کی‌لیت‌های آهن در اختیار گیاه قرار بگیرد، ولی با هزینه و مشکلات زیست محیطی زیادی همراه می‌باشد. یکی دیگر از راههای تأمین Fe گیاهان، استفاده از سویه‌های *ازتوباکتر کروکوکوم*[1] با تولید سیدروفور مناسب می‌باشد که مشکلات روشهای فوق را به دنبال ندارد. *ازتوباکتر کروکوکوم* یک باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن از نوع آزادزی است که علاوه بر تأمین نیتروژن گیاه، با تولید برخی متابولیت‌ها می‌تواند در افزایش رشد گیاه مؤثر واقع شود. از جمله این متابولیت‌ها، سیدروفورها هستند که با متحرک نمودن عناصر کم مصرف مخصوصاً آهن، به رشد گیاه کمک می‌کنند. سیدروفورها ترکیباتی آلی با وزن مولکولی کم (500-2000 دالتون) هستند که لیگاندهای با میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای پیوند با آهن سه ظرفیتی و تمایل کمتری نسبت به سایر فلزات دارند (میلاگرس و همکاران 1999). اهمیت ویژه سیدروفورها در بین انواع متابولیت‌های میکروبی که در ریزوسفر آزاد می‌شوند از یک سو به دلیل نقش کلیدی آهن در فرایندهای حیاتی گیاهان مانند تنفس، سنتز کلروفیل، سنتز پروتئین های هم[2] (سیتوکروم ها، کاتالاز، و پراکسیدازها ...) و پروتئین های غیرهم[3] (ماده ناقل الکترون فرودکسین[4]) است (مارشنر 1995) و از سوی دیگر، به ویژگی‌های خاص آهن در خاک، ارتباط پیدا می‌کند. آهن با مقداری حدود پنج درصد در لیتوسفر، چهارمین عنصر فراوان در پوسته زمین محسوب می‌شود ولی در اکثر خاکها با توجه به شرایط تهویه و pH خنثی تا قلیایی اصولاً به شکل سه ظرفیتی و در ساختار اکسی هیدروکسی‌های نامحلول[5] وجود دارد (شواین و نیلندز 1987). در شرایطی که غلظت آهن خاک بسیار ناچیز است ریزجانداران در پاسخ به شرایط محیط سیدروفور تولید می‌کنند تا بتوانند آهن مورد نیاز خود را از محیط کسب نمایند.

در برخی موارد مشاهده شده است که حتی در مقادیر کافی کودهای نیتروژنی، مایه زنی گیاهان با *ازتوباکتر* موجب افزایش رشد و نمو گیاهان شده است ولی این که این افزایش در رشد به دلیل تثبیت نیتروژن است یا سایر خصوصیات باکتری مثل تولید هورمون یا سیدروفور و.... مطرح هستند، هنوز بطور کامل مشخص نشده است (جیگ ناو و همکاران 1991). چندین مطالعه نشان داده که *ازتوباکتر کروکوکوم* به عنوان زادمایه نه تنها در تثبیت نیتروژن مؤثر است بلکه سایر خصوصیات از قبیل تولید هورمون‌های رشد (رموس و همکاران 2000)، تولید مواد ضد قارچی (لاکشمین آریانا 1993)، تولید سیدروفور (سونجا و همکاران 1996) و حل کنندگی فسفات (نارولا و همکاران 2000) که توسط این باکتری صورت می‌گیرند نیز مهم هستند. به دلیل وجود این قبیل مشکلات و همچنین به دلیل سودمندی سیدروفورهای میکروبی در تأمین آهن مورد نیاز گیاهان و اینکه بیشتر مردم دنیا آهن مورد نیاز خود را از طریق تغذیه از گیاه گندم تأمین می‌کنند، استفاده از سویه‌های توانمند در تولید سیدروفور اهمیت پیدا می‌کند (صدقیانی 1384). بررسی‌ها نشان می‌دهد که برخی سویه‌های *ازتوباکتر* سبب افزایش غلظت عناصر کم مصرف توسط گیاه می‌شوند ولی سازوکارهای اصلی دخیل در این افزایش هنوز به طور کامل مشخص نشده است. یکی از دلایل آن می‌تواند پتانسیل تولید سیدروفور توسط باکتری باشد. هدف از این تحقیق، ارزیابی توان تولید سیدروفور 14 سویه بومی *ازتوباکتر کروکوکوم* جداسازی شده از مزارع گندم اطراف تبریز بصورت درون شیشه‌ای و تعیین اثر آنها در جذب عناصر کم مصرف توسط گیاه گندم در آزمایش گلخانه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

14 سویه *ازتوباکتر کروکوکوم* از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه تبریز دریافت شدند. این سویه‌ها از مزارع گندم اطراف تبریز از قسمت‌های مختلف مزرعه و از عمق 30-0 سانتیمتری ریزوسفر این گیاه و خاک غیرریزوسفر

[1] `*Azotobacter chroococcum*
[2] Heame proteins
[3] Non- heame proteins(Iron-sulfur proteins)
[4] Ferredoxin
[5] Insoluble oxyhydroxides

جداسازی شده بودند. برای تأیید جنس و گونه، علاوه بر آزمونهای مرفولوژیکی و بیوشیمیائی، از تکنیک تعیین توالی 16S rRNA نیز استفاده شد (فرج زاده 1388). ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت وینوگرادسکی (بکینگ 2006) تکثیر و کلنی‌های مورد نظر بدست آمدند. سپس توانایی تولید سیدروفور در شرایط درون شیشه‌ای و به روش کروم آزرول-اس (CAS-آگار) در این سویه‌ها اندازه‌گیری شد (شواین و نیلندز 1987). جهت انجام آزمایش گلخانه‌ای و آماده نمودن خاک گلدان‌ها در شهریور ماه 1387 مقدار 200 کیلوگرم خاک از مزرعه ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان (واقع در شمال شرق شهر تبریز) با مشخصات جدول 1 از عمق 0-30 سانتیمتری تهیه شد. سپس گلدان‌ها با 2 کیلوگرم از خاک عبور داده شده از الک 4 میلیمتری پر گردیدند و در اتوکلاو (121درجه سانتی گراد، فشار یک اتمسفر، به مدت 2 ساعت) سترون شدند. در این بررسی از گندم بهاره رقم فلات (*T.aestivum* L. CV. Falat) استفاده شد که این رقم از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی تبریز تهیه گردید. بذرهای درشت تر، سالم تر و هم اندازه انتخاب سپس سترون و جوانه‌دار شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با 16 تیمارشامل 14 سویه باکتریائی (A-1، A-2، A-3، A-5، A-9، A-10، A-20، A-22، A-23، A-24، A-29، A-31، A-48 و A-51)، شاهد مثبت (با کود نیتروژن و بدون باکتری) و شاهد منفی (بدون کود نیتروژن و بدون باکتری) با چهار تکرار در گلدان‌هایی به قطر14/5 سانتیمتر و ارتفاع12/5 سانتیمتر انجام گرفت. پس از رشد و تکثیر سویه‌های مورد نظر در محیط کشت مایع وینوگرادسکی، جمعیت میکروبی آنها بر اساس معیار مک فارلند در حد OD_{600nm}= 0/7[1] تنظیم شد (کاپوچینو و شرمن 1987). گلدان ها 24 ساعت قبل از کاشت توسط 365 میلی لیتر آب مقطر آبیاری شدند تا رطوبت معادل 10 کیلوپاسکال (FC) ایجاد شود (کیرکهام 2005). سپس 5 حفره سطحی کوچک درون هر گلدان ایجاد و یک عدد بذر جوانه‌دار در داخل هر حفره قرار گرفت. سپس 1 میلی-لیتر سوسپانسیون میکروبی مطابق تیمار مورد نظر بر روی هر بذر و دیواره حفره اضافه شد و در نهایت روی بذر با مقدار کمی خاک پوشانده شد، همچنین سطح خاک گلدان‌ها با لایه نازکی از پرلیت جهت حفظ رطوبت خاک و جلوگیری از آلودگی پوشانیده شد. تمامی گلدان‌ها روزانه از طریق توزین و با آب مقطر سترون آبیاری شدند. چند روز بعد هنگامی که گیاهک‌ها از خاک بیرون آمدند از طریق تنک کردن چهار گیاهچه در هر گلدان باقی گذاشته شد. مقدار کود مصرفی براساس آزمون خاک شامل 75/6 mg kg^{-1} فسفر از منبع سوپر فسفات تریپل، 27/2 mg kg^{-1} پتاسیم از منبع سولفات پتاسیم به تمامی خاک گلدان‌ها و mg kg^{-1} 113/4 نیتروژن از منبع اوره فقط به تیمار شاهد مثبت در همان روز اول (24 ساعت قبل از کاشت توسط 365 میلی لیتر آب مقطر) به خاک گلدان‌ها اضافه شد (بایسواس و موخرجی 1987). گلدان‌ها در شرایط کنترل شده اتاقک رشد (طول دوره روشنائی 14 ساعت، دمای اتاقک رشد در طول شب 2±15 و روز 2±28 درجه سانتی‌گراد و با نور فلورسنت (10000- 8000 لوکس) قرار گرفتند و تا انتهای مرحله سنبله دهی نگهداری شدند. در پایان دوره رشد که حدود سه ماه طول کشید غلظت عناصر آهن، منگنز، روی و مس کل بخش هوایی و ریشه‌ها اندازه گیری شدند (کاتینه1980). همچنین مقدار این عناصر در بخش هوایی و ریشه‌ها و انتقال آنها از ریشه به بخش هوایی نیز محاسبه گردید (گابوس و همکاران 2009). تجزیه واریانس‌ها و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد با استفاده از نرم افزار SPSS و MSTATC انجام شد. همچنین رسم نمودارها با نرم افزار Excel به انجام رسید.

[1] Optical density

جدول 1- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده جهت آزمایش گلخانه‌ای

$CaCO_3$[4]	pH[3]	EC[3]	OM[2]	بافت[1]	رس	سیلت	شن
(%)		($dS\ m^{-1}$)	(%)			(%)	
11/52	8	1/81	1/01	لوم رس شنی	21	21	58

1-(گی 2002) 2- (نلسون و سامرز1996) 3- (پیج 1982) 4- (جکسون 1958)

ادامه جدول 1 غلظت برخی عناصر در خاک مورد استفاده جهت آزمایش گلخانه‌ای

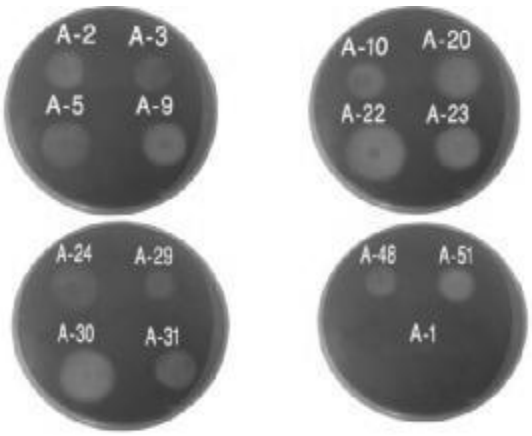
Cu[8]	Mn[8]	Zn[8]	Fe[8]	K[7]	P[6]	N[5]
($mg\ kg^{-1}$)						
1/2	6/2	1/4	2/8	225	6/9	300

5- روش کجلدال (برمنر و مولونی1982) 6- روش اولسن (اولسن و همکاران 1954) 7- روش عصاره گیری با استات آمونیوم (ندسن و پیترسون 1982) 8 - روش DTPA (لیندسی و نورول 1978)

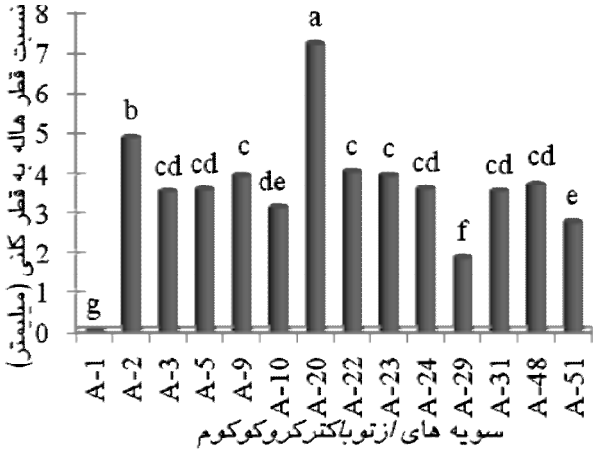
نتایج

توان تولید سیدروفور

بر اساس نتایج حاصله سویه‌های 20 و 2 بیشترین و سویه شماره یک سیدروفوری تولید نکرد و بعد از آن سویه‌های 29 و 51 کمترین تولید کننده سیدروفور می-باشند (شکل 1 و 2).



شکل 1- توان تولید سیدروفور: هاله نارنجی در اطراف کلنی‌های *ازتوباکترکروکوکوم* بیانگر تولید سیدروفور می‌باشد.



شکل 2- مقایسه میانگین‌های های سیدروفور تولید شده بوسیله سویه‌های *ازتوباکتر کروکوکوم*.

مقدار عناصر غذایی

بر اساس شکل 3 سویه‌های 2، 20 و 24 به ترتیب 138/4، 125/7 و 78/8 درصد در مقایسه با تیمار شاهد منفی و 73/4، 64/2 و 30 درصد در مقایسه با تیمار شاهد مثبت مقدار آهن بخش هوایی گیاه گندم را افزایش

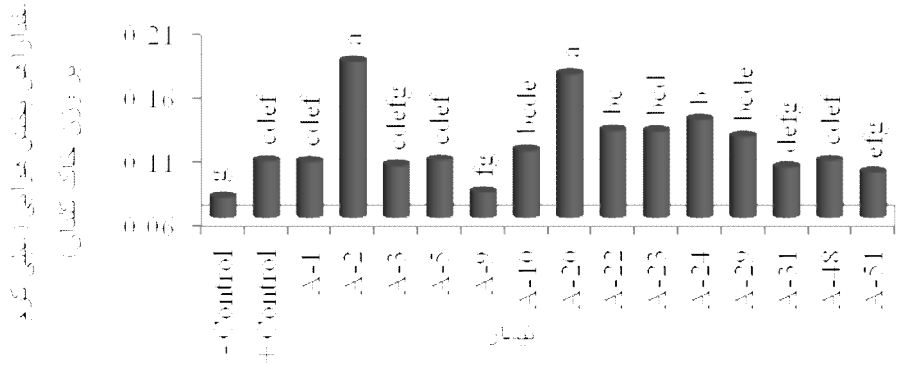
داده‌اند. نتایج شکل 4 نشان می‌دهد که سویه‌های 2، 3، 22، 23، 29، 31 و 48 در مقایسه با تیمار شاهد مثبت به ترتیب 62/6، 50/3، 50/2، 49/5، 46/1، 51/7، 47/5 درصد و در مقایسه با تیمار شاهد منفی 160، 140/3، 140/2، 139، 130/5، 142/5 و 136 درصد باعث افزایش در مقدار آهن ریشه‌ها شده‌اند. مقدار منگنز ریشه‌ها در سویه‌های 3، 10، 29، 48 و 51 در مقایسه با تیمار شاهد منفی به ترتیب 87/2، 89/2، 61/5، 66/8 و 79/1 درصد افزایش یافت. بین سایر سویه‌ها با یکدیگر و با تیمارهای شاهد مثبت و شاهد منفی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (شکل 5). شکل 6 نشان می‌دهد که تیمار شاهد مثبت و سویه‌های 2، 22 و 51 در مقایسه با تیمار شاهد منفی به ترتیب 50/8، 36/5، 47/7 و 47/1 درصد باعث افزایش مقدار روی بخش هوایی گیاه گندم شده‌اند. مقایسه میانگین‌های مقدار روی ریشه‌های گیاه گندم نشان می‌دهد که سویه‌های 2، 20، 22 و 51 در مقایسه با تیمار شاهد منفی به ترتیب 61/8، 71/7، 60/7 و 73/3 درصد مقدار روی ریشه‌های گیاه گندم را افزایش دادند (شکل 7). سویه 10 مقدار مس بخش هوایی و ریشه‌ها را در مقایسه با تیمار شاهد مثبت به ترتیب 29 و 68/3 درصد و در مقایسه با شاهد منفی به ترتیب 72/5 و 61/3 درصد افزایش داده است (شکل 8 و 9).

غلظت عناصر غذایی

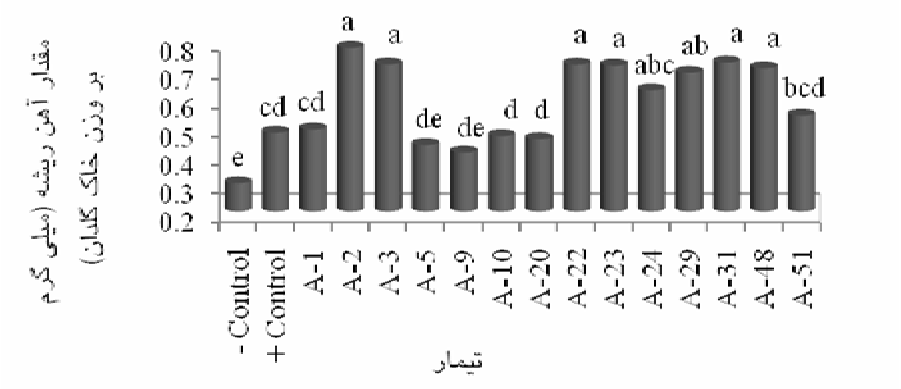
روند مقایسه میانگین‌ها در مورد غلظت عناصر تقریباً مشابه با وضعیت مقدار عناصر می‌باشد.

انتقال آهن، منگنز، روی و مس از ریشه به بخش هوایی (شاخص انتقال)

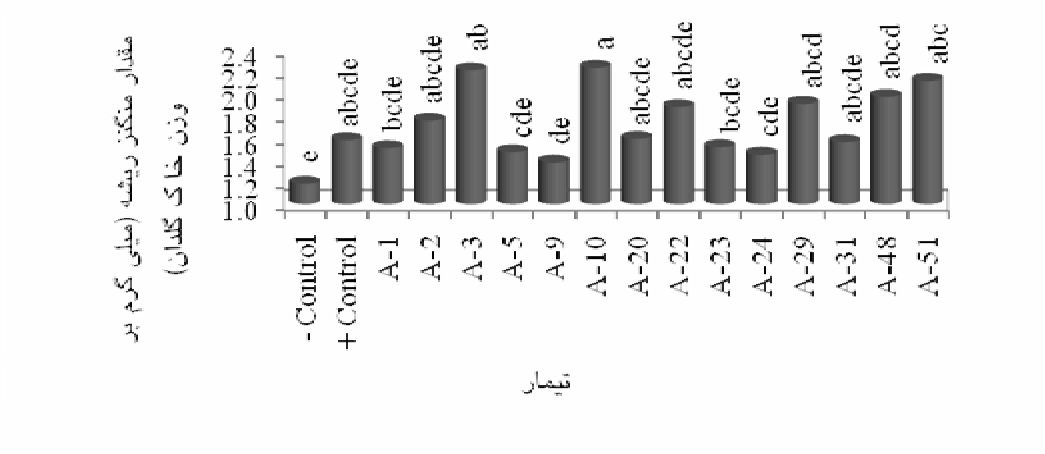
طبق شکل 10 سویه 20 در مقایسه با سایر سویه‌ها و تیمارهای شاهد مثبت و شاهد منفی اثر معنی‌داری در انتقال آهن از ریشه به بخش هوایی داشته است. به طوری‌که این سویه در مقایسه با تیمارهای شاهد مثبت و شاهد منفی به ترتیب 56/7 و 37/2 درصد مقدار آهن بیشتری را از ریشه‌ها به بخش هوایی انتقال داده است. انتقال روی از ریشه به بخش هوایی در سویه‌های 24 و 29 افزایش معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد منفی و سایر سویه‌ها به جز سویه 23 و تیمار شاهد مثبت را نشان می‌دهد (شکل 11). این سویه‌ها در مقایسه با تیمار شاهد مثبت به ترتیب 23/8 و 22 درصد و در مقایسه با تیمار شاهد منفی به ترتیب 40/7 و 38/6 درصد مقدار روی بیشتری را از ریشه به بخش هوایی انتقال داده‌اند. مقایسه میانگین‌های انتقال مس از ریشه به بخش هوایی در شکل 12 نشان می‌دهد که همه سویه‌ها به جز سویه‌های 2، 5 و10 سبب افزایش معنی‌داری در انتقال مس از ریشه به بخش هوایی در مقایسه با تیمار شاهد مثبت شده اند. همچنین همه سویه‌ها به جز سویه 10 در مقایسه با تیمار شاهد منفی مس بیشتری را از ریشه گندم به بخش هوایی انتقال داده‌اند.



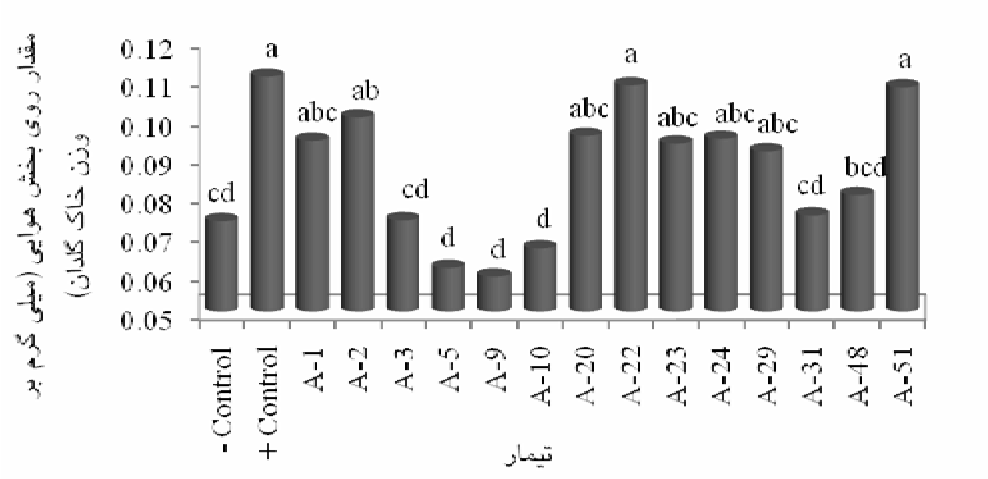
شکل 3- مقایسه میانگین‌های تأثیر سویه‌های مختلف *ازتوباکتر* بر مقدار آهن بخش هوایی گندم.



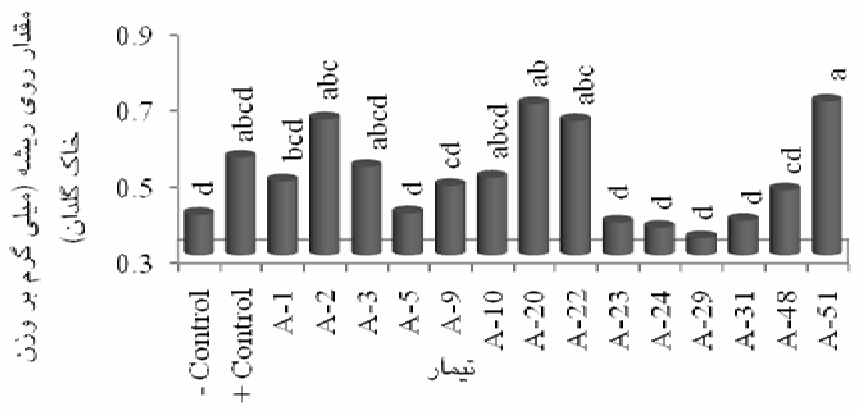
شکل 4- مقایسه میانگین‌های تأثیر سویه‌های مختلف *ازتوباکتر* بر مقدار آهن ریشه گندم.



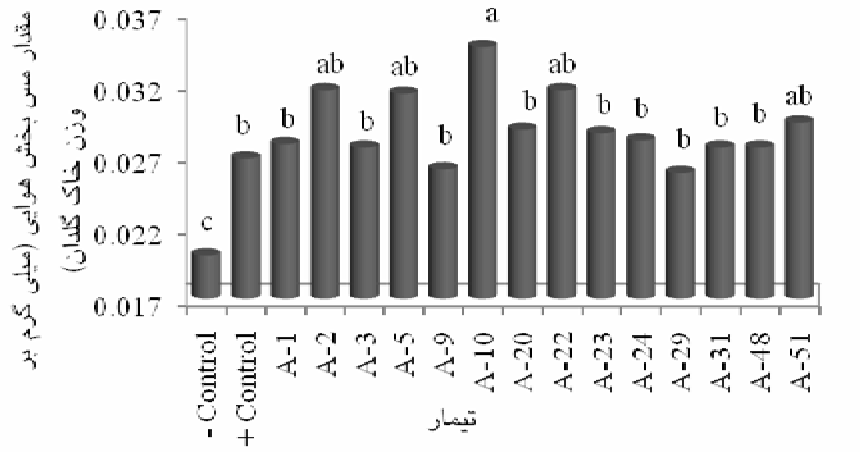
شکل 5- مقایسه میانگین‌های تأثیر سویه‌های مختلف *ازتوباکتر* بر مقدار منگنز ریشه گندم.



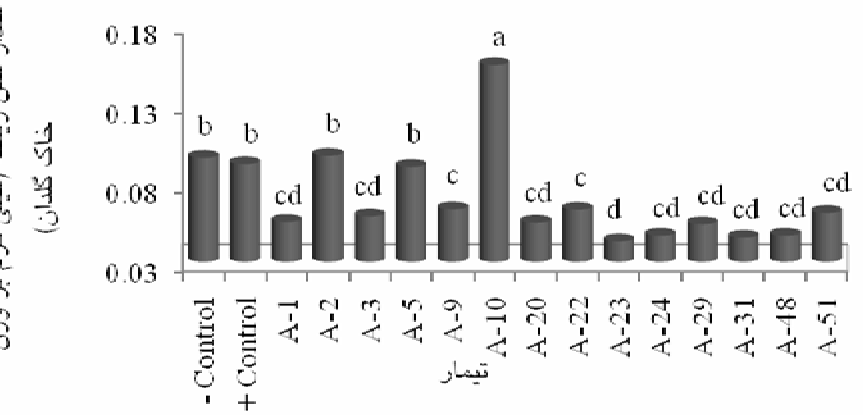
شکل 6- مقایسه میانگین‌های تأثیر سویه‌های مختلف *ازتوباکتر* بر مقدار روی بخش هوایی گندم.



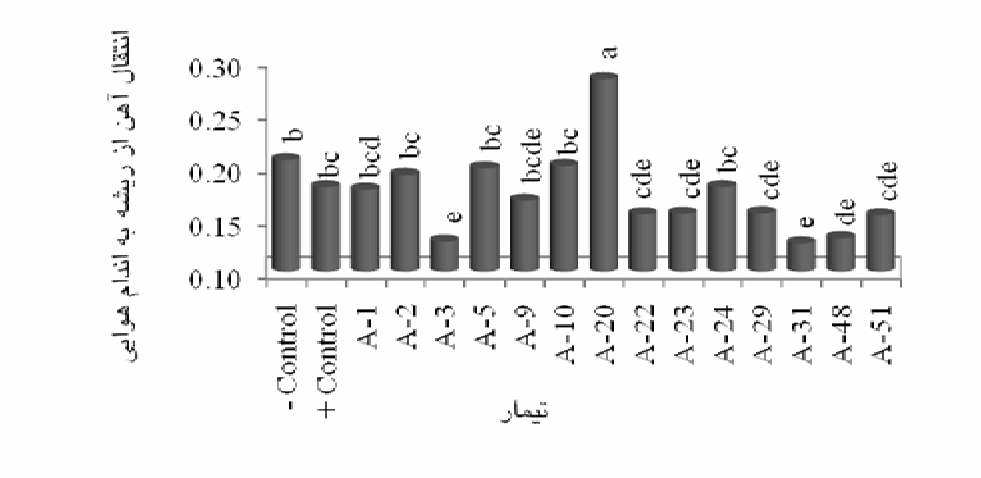
شکل 7- مقایسه میانگین‌های تأثیر سویه‌های مختلف *ازتوباکتر* بر مقدار روی ریشه گندم.



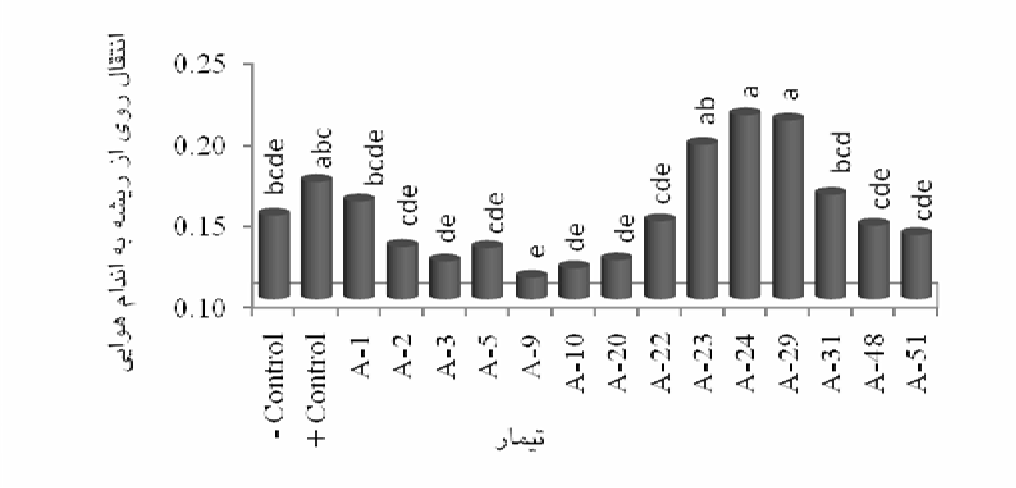
شکل 8- مقایسه میانگین‌های تأثیر سویه‌های مختلف *ازتوباکتر* بر مقدار مس بخش هوایی گندم.



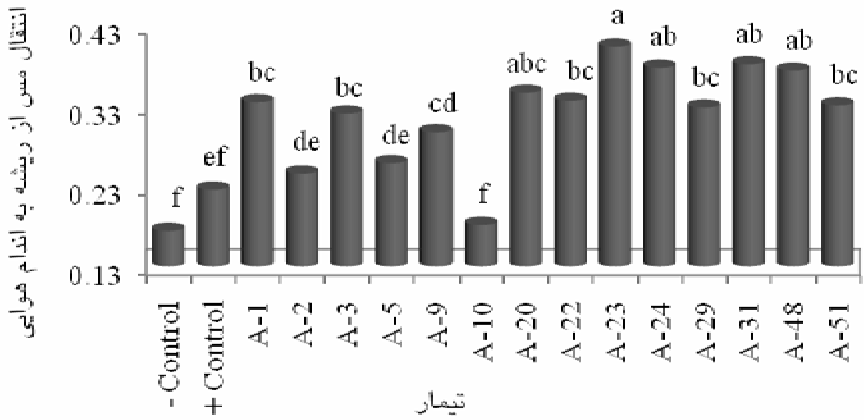
شکل 9- مقایسه میانگین‌های تأثیر سویه‌های مختلف *ازتوباکتر* بر مقدار مس ریشه گندم.



شکل 10- مقایسه میانگین‌های تأثیر سویه‌های مختلف *ازتوباکتر* بر انتقال آهن از ریشه به بخش هوایی گندم .



شکل 11- مقایسه میانگین‌های تأثیر سویه‌های مختلف *ازتوباکتر* بر انتقال روی از ریشه به بخش هوایی گندم .



شکل 12- مقایسه میانگین‌های تأثیر سویه‌های مختلف *ازتوباکتر* بر انتقال مس از ریشه به بخش هوایی گندم.

بحث

توان تولید سیدروفور

بر خلاف اثر بازدارندگی محیط CAS-آگار برای تعدادی از ریزجانداران، *ازتوباکتر* کروکوکوم قادر به رشد بر روی این محیط است و به وضوح توانایی یا عدم توانایی تولید سیدروفور را از خود نشان می‌دهد (رجایی و همکاران 1386). از بین تمام سویه‌ها تنها سویه شماره یک در محیط کشت انتخابی CAS-آگار قادر به رشد نبود که نشان دهنده عدم تولید سیدروفور توسط این سویه است. نتایج حاصله نشان می‌دهد سویه‌های *ازتوباکتر* کروکوکوم مورد استفاده در این بررسی قابلیت نسبتاً خوبی در تولید سیدروفور دارند. در یک بررسی رجایی و همکاران (1386) نشان دادند که سویه‌های *ازتوباکتر* کروکوکوم بومی جداسازی شده از خاکهای استان چهارمحال و بختیاری توانایی نسبتاً خوبی در تولید سیدروفور دارند. همچنین توانایی تولید سیدروفور سویه‌های *ازتوباکتر* کروکوکوم بومی خاکهای هندوستان توسط سونجا و همکاران (1996) گزارش شده است.

غلظت و مقدار آهن بخش هوایی و ریشه‌ها

غلظت و مقدار آهن گیاه گندم در حضور سویه‌های مختلف *ازتوباکتر* کروکوکوم افزایش یافت. این افزایش غلظت و مقدار آهن مخصوصاً بخش هوایی در حضور سویه‌های 2 و 20 در مقایسه با سایر سویه‌های دیگر بیشتر بود. همانطور که در شکلهای 1 و 2 نیز مشاهده می‌شود این سویه‌ها از توان تولید سیدروفور بالایی برخوردار بودند. با توجه به اینکه، سیدروفورها ترکیباتی آلی با وزن مولکولی کم (500-2000 Da) هستند که لیگاندهای با میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای پیوند با آهن سه ظرفیتی و تمایل کمتری نسبت به سایر فلزات دارند (میلاگرس و همکاران 1999)، به نظر می‌رسد یکی از دلایل افزایش غلظت و مقدار آهن گیاه تولید سیدروفور بوده است. لاکشیمن‌آریانا (1993) با بررسی تولید سیدروفور و تثبیت بیولوژیک نیتروژن سویه‌های *ازتوباکتر* کروکوکوم بومی خاکهای هندوستان مشاهده کرد که مایه زنی این سویه‌ها بر محصولات غله‌ای و دانه‌های روغنی اثر مفیدی گذاشته است و بیان نمود که این اثر مفید احتمالاً به خاطر تولید سیدروفور و تثبیت بیولوژیک نیتروژن توسط این سویه‌ها بوده است.

غلظت و مقدار منگنز بخش هوایی و ریشه‌ها

علت عدم تغییر معنی‌دار غلظت و مقدار منگنز بخش هوایی و غلظت منگنز ریشه‌های گیاه شاید این طور تفسیر شود که *ازتوباکتر* تا حدودی می‌تواند Mn^{2+} را به Mn^{4+} اکسید کند که Mn^{4+} فرم بسیار سخت محلول است لذا علی‌رغم حضور سیدروفور در اطراف ریشه، جذب Mn افزایش نیافته است (علی اصغرزاد 1376). علی پور و همکاران (1383) گزارش کردند که مایه زنی *ازتوباکتر* بر مقدار منگنز برگ سیب اثر معنی داری را نشان نداد. همچنین داتلیا و سین (1977) نشان دادند که با افزایش میزان آهن در خاک، شکل‌های قابل جذب منگنز شدیداً کاهش می‌یابد لذا احتمالاً حضور سیدروفور در اطراف ریشه که سبب حل شدن آهن خاک شده مانع از جذب Mn به وسیله گیاه شده است.

غلظت و مقدار روی بخش هوایی و ریشه‌ها

غلظت و مقدار روی بخش هوایی و ریشه گیاه گندم در حضور برخی سویه‌های باکتری افزایش یافت. با توجه سیدروفورها تمایل بیشتری به تشکیل کمپلکس با آهن فریک و تمایل کمتری با دیگر عناصر را دارند احتمال می‌رود به دلیل تمایل کمتر تشکیل کمپلکس سیدروفور با روی، سازوکارهای دیگری در این افزایش غلظت و مقدار روی در گیاه گندم دخیل بوده است. امّا افزایش غلظت و مقدار روی تیمار شاهد مثبت بخش هوایی و ریشه گیاه گندم را می‌توان این چنین تفسیر کرد که چون این تیمار تنها کود نیتروژن از منبع اوره دریافت کرده و بدون مایه زنی باکتری بوده است احتمالاً به خاطر برهمکنش مثبت بین نیتروژن با روی و همچنین کاهش pH ریزوسفر در حضور کود اوره بر اثر نیترات سازی و جذب آمونیوم سبب شده تا غلظت و مقدار روی بخش هوایی و ریشه گیاه گندم در این تیمار افزایش یابد

(ورما و باگت 1990). اثر مایه زنی سویه‌های مختلف *ازتوباکتر کروکوکوم* بر افزایش غلظت و مقدار روی در گیاهان گندم و ذرت توسط محققان زیادی گزارش شده است (رجایی و همکاران 1386، سیرافی و همکاران 2006، گواد 2008).

غلظت و مقدار مس بخش هوایی و ریشه‌ها

هر چند که اثر مایه زنی باکتری بر افزایش غلظت و مقدار مس بخش هوایی و ریشه گیاه گندم معنی‌دار بود ولی به جز برخی سویه‌ها مخصوصاً سویه 10 بقیه سویه‌ها تفاوت معنی‌داری با تیمارهای شاهد مثبت و شاهد منفی نداشتند. مخصوصاً در مورد غلظت و مقدار مس ریشه به جز سویه 10 بقیه اثر منفی بر غلظت و مقدار مس ریشه گذاشته بودند. از آنجا که مس در حضور مقدار زیاد مواد آلی کمپلکس بسیار پایداری تشکیل می‌دهد و به سختی جدا می‌شود (ملکوتی 1378)، احتمالاً ازتوباکترها یکسری ترشحات آلی خاصی از جمله پلی‌ساکاریدی و موکوئیدی دارند و با مس تشکیل کمپلکس بسیار قویی داده لذا علی‌رغم حضور سیدروفور در اطراف ریشه غلظت و مقدار مس گیاه زیاد افزایش نیافته است. به نظر می‌رسد سویه 10 که دارای کلنی خشکی بوده پلی ساکارید و کمتری ترشح کرده و لذا غلظت و مقدار مس ریشه و بخش هوایی در حضور این سویه بیشتر بوده است. خسروی و همکاران (2009) اثر مایه زنی 4 سویه *ازتوباکتر کروکوکوم* را بر نهال های جوان سیب بررسی و گزارش کردند که در بین 4 سویه، سویه AFA_{146} بیشترین تأثیر را بر افزیش جذب عناصر K، Mg، Fe، Mn، Zn و B برگ سیب و N، P، K، Mn و Zn ریشه نهال های سیب داشت. در حالی که اثر مایه زنی بر جذب مس بی تأثیر بود. علی پور و همکاران (1383) نتایج مشابهی را گزارش کردند. در حالیکه سیرافی و همکاران (2006) و گواد (2008) اثر مایه زنی باکتری *ازتوباکتر* را بر غلظت و مقدار مس در گیاهان گندم و ذرت مثبت و معنی دار گزارش نمودند.

انتقال عناصر آهن، منگنز، روی و مس از ریشه به بخش هوایی

مایه زنی باکتری اثر معنی‌داری بر انتقال عناصر آهن، روی و مس از ریشه به بخش هوایی گذاشت و تنها در مورد منگنز اثر مایه زنی باکتری غیر معنی‌دار بود. بدین صورت که سویه‌های مؤثر در انتقال آهن از ریشه به بخش هوایی از لحاظ تولید سیدروفور نیز سویه‌های برتر بودند. ظاهراً این سویه‌ها مخصوصاً سویه 20 با توجه به اینکه مقدار آهن ریشه‌ها در حضور سویه 20 کمتر بود با تولید مواد محرک رشد اطراف ریشه‌ها سبب انتقال بهتر این عنصر از ریشه‌ها به بخش هوایی می-شوند. در مورد انتقال عناصر روی و مس از ریشه به بخش هوایی احتمالاً سازوکارهای دیگری دخیل بوده است. اساساً انتقال کاتیونها می‌تواند توسط اسیدهای آمینه کربوکسیلی و یا اسیدهای آلی تسهیل شود. *ازتوباکتر* توانایی ساخت ویتامین‌های B_1، B_2، B_6، B_{12}، پانتوتنیک اسید، نیکوتینیک اسید، و اسیدهای آلی مانند اسید مالیک و اسید سیتریک را دارد (مارتینز و همکاران1996). همچنین قادر به ساختن اسیدهای آمینه مانند آرژینین، لیزین، تریپتوفان، هیستیدین، سیستئین، پالمتیک اسید،گلوتامیک اسید می‌باشد (گونزالز-لوپز 1983). می‌توان تصور نمود که مقدار این مواد ریشه‌های مایه زنی شده با *ازتوباکتر* افزایش می‌یابد و به دنبال این افزایش، انتقال این مواد به بخش های هوایی بیشتر می-شود و یونها را همراه خود حمل می‌نمایند. همچنین انتقال بیشتر عناصر به بخش های هوایی در گیاهان مایه زنی شده با *ازتوباکتر* به اثر احتمالی هورمونی مانند سیتوکینین و نیز اثر سیدرفور به عنوان عوامل محرک رشد گیاه نسبت داده می‌شود که ضمن تحریک رشد ریشه سبب هدایت یونهای ضروری به بخشهای هوایی می‌شود (مارتینز تودلو و همکاران 1989). حاجی بلند و همکاران (1383) با بررسی اکولوژیکی *ازتوباکتر* در دو منطقه مرتعی آذربایجان و اثر مایه زنی آن بر انتقال عناصر نیتروژن و پتاسیم در گیاه گندم نشان دادند که ازتوباکترها بر انتقال این عناصر از ریشه به بخش هوایی تأثیر مثبتی دارند و آن را به اثر احتمالی ترکیبات آلی تولید شده ریشه که این عناصر را با خود به بخش هوائی انتقال می‌دهند نسبت دادند.

منابع مورد استفاده

حاجی بلند ر، علی اصغرزاد ن و مهرفر ز،1383. بررسی اکولوژیکی *ازتوباکتر* در دو منطقه مرتعی آذربایجان و اثر مایه زنی آن روی رشد و تغذیه معدنی گیاه گندم. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ،سال هشتم، شماره دوم، صفحه‌های 90-75.

رجایی س، علیخانی ح، رئیسی ف، 1386. اثر پتانسیل‌های محرک رشد سویه‌های بومی *ازتوباکتر کروکوکوم* روی رشد، عملکرد و جذب عناصر غذایی در گندم. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. سال یازدهم. شماره چهل و یکم (ب). صفحه‌های 287-285.

رسولی صدقیانی م ح، 1384. بررسی نقش فیتوسیدروفورها و سودوموناس‌های تولید کننده سیدروفور در تأمین آهن و روی مورد نیاز ارقام گندم. رساله دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

علی اصغرزاد ن، 1376. میکروبیولوژی و بیوشیمی خاک(ترجمه). چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تبریز. صفحه‌های 393-391.

علی‌پور زت، ملکوتی م ج و خسروی ه، 1383. بررسی تأثیر کود بیولوژیک *ازتوباکتر* بر رشد و تغذیه نهال سیب در خاکهای آهکی. خلاصه مقالات سومین همایش ملی توسعه‌ی کاربرد مواد بیولوژیک و استفاده بهینه از کود و سم در کشاورزی. کرج. نشر آموزش کشاورزی . صفحه‌های 300 – 299.

فرجزاده د، 1388. بررسی فعالیت ACC-دآمیناز ازتوباکترهای بومی و امکان سنجی انتقال ژن این آنزیم از ریزوبیوم به *ازتوباکتر*. رساله دکتری . دانشکده کشاورزی. دانشگاه تبریز.

ملکوتی م ج، 1378. نقش ریز مغذی‌ها در افزایش عملکرد و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی " عناصر خرد با تأثیر کلان" . انتشارات دانشگاه تربیت مدرس. شماره 43. صفحه‌های: 221-70.

Becking JH, 2006. The Prokaryotes. Pp: 759-783. Falkows, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, (Eds.). Third edition. Springer Science Business Media LLC New York. Chapter 3.3.26. The Family Azotobacteraceae.

Biswas TD and Mukherjee SK, 1987. Text Book of Soil Science. Second edition. Division of Soil Science and Agricultural Chemistry. IARI. New Delhi.

Bremner JM and Mulvaney CS, 1982. Nitrogen-Total. Pp. 595-622. In: Page AL (ed.). Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Second Edition. ASA and SSSA Madison, WI.

Cappuccino JG and Sherman, N. 1987. Microbiology. A Laboratory Manual. The Benjamin/ Cummings publishing Co. Inc.

Cottenie A, 1980. Soil and Plant Testing. FAO Soils Bulletin. No. 38/2.

Datliya SS and Singh M, 1977. Effect of $CaCO_3$ and iron application of the availability and magannese in light-texture soil. Plant Soil 46: 239-243..

Gabos MB, Abreu CA and Coscione AR., 2009. EDTA assisted phytoremediation of a Pb contaminated soil: Metal leaching and uptake by jack beans. Sci Agric 66: 506-514.

Gawad -Abd El AM. 2008. Employment of bio-organic agriculture technology for *Zea mays* cultivation in some desert soils. J Agric Biol Sci 4: 553-565.

Gee GW and OR D, 2002. Particle size analysis. Pp. 201-414 In: Jacob HD and Clarke GT. (Eds). Methods of Soil Analysis. Part 4. Physical Methods. ASA and SSSA Madison, WI., USA.

Gonzalez-lopes J, Slmern V and Moreno J, 1983. Amino acid and vitamins produced by *Azotobacter vinelandii* in chemically- defined media and dialyzed soil media. Soil Biol Biochem 6: 711- 713.

Jackson ML, 1958. Soil Chemical Analysis. Printice- Hall.USA

Jagnow G, Hoeflich G and Hoffmann KH, 1991. Inoculation of non-symbiotic rhizosphere bacteria: Possibilities of increasing and stabilizing yield. Angew Bottanik 65: 97-126.

Khosravi H, Samar SM, Fallahi E, Davoodi H and Shahabian M, 2009. Inoculation of Golden Delicious' apple trees on M9 rootstock with *Azotobacter* improves nutrient uptake and growth indices. J Plant Nutr 32: 946-953.

Kirkham MB, 2005. Principles of Soil and Plant Water Relations. Elsevier Academic Press.

Lakshminarayana K, 1993. Influence of *Azotobacter* on nutrition of plant and crop productivity. Proc Indian Nat Sci Acad B59: 303–308.

Lindsay WL and Norvel WA, 1978. Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Sci Soc Am J 42: 421–428.

Marschner H, 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academi Press, London.

Martinez Toledo MV, Moreno J, De la Rubia T and Gozalezlopez J, 1989. Root exudates of Zea mays and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococcum*. Plant Soil 110: 149-152.

Martinz-Toledo MVB, Rofelas V, Salmeron C, Pozo and Gonzalez-Lopez J, 1996. Production of pantothenic acid and thiamine by *Azotobacter vinelandii* in a chemically defined medium and a dialyzed soil medium. Biol Fertil Soil 22: 131-135.

Milagres AMF, Machuca A and Napoleao D, 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome S (CAS) agar plate assay. J Microbial Methods 37: 1-6.

Narula N, Kumar V, Behl RK, Deubel A, Gransee A and Merbach W, 2000. Effect of P-solubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P, K uptake in P-responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. J Plant Nutr Soil Sci 163: 393–398.

Nelson DW and Sommers LE, 1996. Total carbon, organic carbon and organic matter. Pp. 961-1010. In: Sparks DL (ed). Methods of Soil Analyses. Part 3. Chemical Methods. ASA and SSSA Madison, WI.

Nudsen D and Peterson GA, 1982. Lithium, sodium, and potassium. Pp. 225-245. In: Page AL (ed). Methods of Soil Analysis. Part 2. Second Edition. Chemical and Microbiological Properties. ASA and SSSA Madison, WI.

Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS and Dean LA, 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. USDA Circ. 939, US Gov Printing Office. Washington, DC.

Remus r, Ruppel S, Jacob HJ, Hecht-Buchholz CH and Merbach W, 2000. Colonization behavior of two enteobacterial strains on cereals. Biol Fertil Soils 30: 550-557.

Schwyn B and Neilands JB, 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem 160: 47-56.

Sirafy EZM, Woodard HJ and Norjar EEM, 2006. Contribution of biofertilizers and fertilizer nitrogen to nutrient uptake and yield of Egyptian winter wheat. J Plant Nutr 29: 587 – 599.

Suneja S, Narula N, Anand RC and Lakshminarayana K, 1996. Relationship of *Azotobacter chroococcum* siderophores with nitrogen fixation. Folia Microbiol 41: 154-158.

Verma TS, and Bhagat RM, 1990. Zinc and nitrogen interaction in wheat grown in limed and unlimed acid alfisol. Fertil Res 22: 29-35.